

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS DE PRESERVAÇÃO DE *Xanthomonas arboricola* pv pruni CEPA 46, APÓS 12 ANOS

GEOVANE DIEL DE OLIVEIRA¹; MARIANE IGANSI ALVES²; KARINE LASTE MACAGNAN³; EDUARDO DOS SANTOS MACEDO COSTA⁴; ANGELITA DA SILVEIRA MOREIRA⁵

¹Universidade Federal de Pelotas - geovanediel@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - marianeigansialves@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – karinemacagnan@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – eduardodossantosmacedocosta@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – angelitadasilveiramoreira@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A preservação de microrganismos é de interesse científico, tecnológico e industrial, devido à capacidade destes de produzir produtos de interesse como enzimas, vitaminas, aminoácidos, polissacarídeos. A manutenção adequada tem como intuito conservar características genéticas de uma determinada cepa e ter em estoque os microrganismos viáveis caso ocorram contaminações ou mutações que causem a perda de rendimento do produto final desejado (BROECKX et al., 2016; NASRAN et al., 2020).

Dentre os microrganismos de interesse industrial destacamos as bactérias gram-negativas do gênero *Xanthomonas*, que produzem o exopolissacarídeo chamado xantana que possui propriedades reológicas de interesse para diferentes indústrias (GARCÍA-OCHOA et. al, 2000).

Os microrganismos diferem entre si em termos de resistência às técnicas de preservação. As técnicas, por sua vez, diferem principalmente em relação ao estado fisiológico ou vital que mantém as células (PRAKASH et al., 2013), ao tempo de preservação que permitem (GIRÃO et al., 2004; PRAKASH et al., 2013) e o tipo de equipamento e especialização de mão de obra necessários para sua realização (BROECKX et al., 2016).

Os métodos tradicionais e difundidos de preservação de microrganismos são a liofilização, o congelamento e o ultracongelamento. Contudo, são métodos que requerem equipamentos específicos e acabam encarecendo o processo. Métodos alternativos de preservação como solo, tiras de papel, pérolas de vidro e procelana, e ganham importância frente à ausência de estruturas exigidas por outras formas de preservação, como liofilizadores e ultrafreezers, e também como uma maneira de viabilizar o transporte. Técnicas simples de conservação, não baseadas na refrigeração, são cada vez menos empregadas e estudadas; no entanto, em situações como o isolamento de estípites no meio selvagem e o transporte não refrigerado, continuam a ser essenciais (BOROWSKI et al., 2023).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade de *Xanthomonas arboricola* pv pruni cepa 46, preservadas por técnicas alternativas em solo estéril, pérolas de vidro e sementes, por 12 anos..

2. METODOLOGIA

Neste estudo utilizou-se a linhagem de *Xanthomonas arboricola* pv pruni, cepa 46. No ano de 2011, as células foram multiplicadas em meio líquido Yeast Malt (YM) (JEANES, 1974), a partir de colônias isoladas mantidas em meio SPA sólido (HAYWARD, 1964), conforme procedimentos recomendados para a produção de

inóculo por Vendruscolo et al. (2004). Os processos foram conduzidos em frascos *Erlenmeyer* com volumes totais de 50 mL, em incubadora com agitador orbital a 28°C, 150 rpm por 24 h. Nos tempos 0 e 24 h de incubação, as concentrações bacterianas foram avaliadas através de diluições seriadas e plaqueamento, expressas em UFC mL⁻¹ (BOROWSKI, 2011). A cepa foi preservada por diferentes técnicas alternativas de preservação em mini-dessecadores montados em frascos tipo penicilina contendo sementes de girassol, pérolas de vidro, solo estéril, conforme Borowski (2011), e armazenadas sob refrigeração por 12 anos.

Para avaliação de uma possível sobrevivência, procedeu-se a recuperação das amostras. Depositou-se 3 sementes, 3 pérolas e a porção superior do solo que continha a região inoculada, respectivamente, para a reidratação, em frascos de penicilina contendo 1 mL de meio de cultivo YM. Amostras foram coletadas após o tempo padrão de hidratação, 20 minutos (BOROWSKI, 2011), avaliou-se também após 3 h em agitador orbital a 28°C e 150 rpm. Após a recuperação das culturas, avaliou-se a viabilidade celular das mesmas através da cultura em placas em meio sólido SPA, de 50 µL da suspensão bacteriana e diluições seriadas obtidas, em seguida incubadas em estufa por 48 h, e realizou-se a contagem das colônias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 estão demonstrados os resultados da concentração celular e percentual de sobrevivência de células preservadas pelas técnicas alternativas.

Na metodologia descrita por Borowski (2011), onde deposita-se os conteúdos dos mini-dessecadores deixando em repouso por 20 minutos em seguida realiza-se as diluições no cultivo em meio sólido não observou-se crescimento celular em nenhum dos tratamentos. Observou-se que o microrganismo utilizado necessitou de condições mais favoráveis por um período maior que 20 minutos, como utilizado normalmente em outras metodologias de preservação para a reativação celular.

No entanto, ao colocar os materiais com os microrganismos preservados em agitador orbital, observou-se o crescimento de *Xanthomonas* de $9,6 \times 10^4$ UFC mL⁻¹, para a técnica com sementes de girassol, alcançando-se 0,0032% de sobrevivência (Tabela 1). Nas preservações com solo esterilizado e pérola de vidro cresceram apenas contaminações.

Borowski (2011), após 30 dias de preservação, observou que a técnica alternativa de preservação em sementes manteve o maior percentual de sobrevivência de células.

Tabela 1. Concentração celular e percentual de sobrevivência de células preservadas por técnicas alternativas.

Técnica de preservação	Concentração inicial	Concentração celular (UFC mL ⁻¹) e percentual de sobrevivência (%)			
		30 dias*		12 anos	
Sementes de girassol	$3,0 \times 10^9$	$6,0 \times 10^5$	0,020	$9,6 \times 10^4$	0,0032
Solo estéril		$2,1 \times 10^5$	0,007	0	0
Pérola de vidro		$2,0 \times 10^3$	0,00007	0	0

*Resultados descritos por Borowski (2011).

A técnica de preservação em pérolas de vidro é descrita como não propagativa (SMITH, 1994), sendo assim, cessa completamente o metabolismo celular, desse modo é compreensível não observar o crescimento de unidades formadoras de colônia após 12 anos de preservação.

As metodologias de preservação em sementes e solo estéril são descritas como métodos semi-propagativos, ou seja, elas permitem a multiplicação celular mesmo que lenta (SMITH, 1994). No presente estudo, com a observação de contaminações nas amostras de solo acredita-se que embora tenha sido esterilizado devidamente, a presença de esporos e biofilmes resistentes possam ter inviabilizado à preservação por longo período do cultivo estudado. Ao compararmos as preservações em solo e pérolas à preservação em sementes de girassol, os resultados obtidos reforçam o que foi sugerido por Salcedo et al. (1992), que tratar-se de um método semi-propagativo, pois as sementes apresentam naturalmente nutrientes que criam um micro-ambiente favorável para a preservação e viabilidade do microrganismo, além dos nutrientes presentes no meio YM, no qual as sementes foram previamente embebidas.

Salcedo et al. (1992) também avaliaram a preservação de *X. campestris* em sementes de couve e observaram uma sobrevivência de 10% do inicial após 20 meses de preservação. Segundo os autores, o método apresenta como vantagens a fácil inoculação, ausência de transferências, menor risco de contaminação, além de melhorar a taxa de crescimento das bactérias no meio de cultivo, após recuperação.

Borowski et al. (2023) objetivou determinar a eficácia da liofilização na preservação a longo prazo da mesma cepa estudada. Após 12 anos de preservação, a cepa recuperada foi viável com percentual de sobrevivência de 0,031%. Resultado muito similar ao encontrado no presente trabalho para a técnica de preservação em semente, indicando que o método pode ser utilizado para a preservação a longo prazo do microrganismo em questão.

4. CONCLUSÕES

A técnica de preservação alternativa utilizando sementes de girassol é adequada para a manutenção da viabilidade a longo prazo. Análises futuras irão averiguar se as capacidades de produção de xantana pela cepa 46 preservada foram mantidas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOROWSKI, J. M. **Influência de métodos clássicos e alternativos de preservação de cepas de *Xanthomonas arboricola* pv pruni na produção, viscosidade e composição química da xantana.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.
- BOROWSKI, J.M.; MACAGNAN, K.L.; ALVES, M.I.; AQUINO, F.I.; VENDRUSCOLO, C.T.; MOREIRA, A.daS. Long term classical methods for the preservation of xanthan gum-producing - *Xanthomonas arboricola* pathovar pruni strains. **Colloquium Agrariae**, v. 19, p. 226-245, 2023.
- BROECKX, G., VANDENHEUVEL, D., CLAES, I.J.J., LEBBER, S. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. **Int. J. Pharm.**, v. 505, p. 303–318, 2016.

- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery and properties. *Biotechnology Advances*, v.18, p. 549-579, 2000.
- GIRAO, M.D., PRADO, M.R., BRILHANTE, R.S.N., CORDEIRO, R.A., MONTEIRO, A.J., SIDRIM, J.J.C., ROCHA, M.F.G. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 37, p. 229–233, 2004.
- HAYWARD, A.C. Characteristies of *Pseudomonas solonacearum*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 27, n. 2, p. 265-277, 1964.
- JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides – New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, v. 28, p. 34-40, 1974.
- NASRAN, H.S., MOHD YUSOF, H., HALIM, M., ABDUL RAHMAN, N. Optimization of protective agents for the freeze-drying of *Paenibacillus polymyxa* Kp10 as a potential biofungicide. **Molecules**, v. 25, p. 2618, 2020.
- PRAKASH, O., NIMONKAR, Y., SHOUCHE, Y.S. Prática e perspectivas de preservação microbiana. **FEMS Microbiol. Vamos**. 339, 1–9, 2013.
- SALCEDO, G.; RAMÍREZ, M. E.; FLORES, C.; GALINDO, E. Preservation of *Xanthomonas campestris* in *Brassica oleracea* seeds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.37, p.723-727, 1992.
- SMITH, D.; ONIONS, A. H. S. **The preservation and maintenance of living fungi**. CAB International, Wallingford, United Kingdon, 1994.122 p.